

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 28 AUG 2000

WIPO

PCT

85/01

EP 00 / 0 6 8 6 1

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

E J 4

Aktenzeichen:

199 33 719.5

Anmeldetag:

19. Juli 1999

Anmelder/Inhaber:

MediGene Aktiengesellschaft,
Planegg/DE

Bezeichnung:

Strukturprotein in Adeno-assoziiertem Virus mit
veränderten chromatographischen Eigenschaften,
seine Herstellung und Verwendung

IPC:

C 07 K, A 61 K, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

München, den 15. Juni 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Seiler

Seiler

5 **Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus mit veränderten
chromatographischen Eigenschaften, seine Herstellung und Verwendung**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem
Virus, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Veränderung der
chromatographischen Eigenschaften bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.

15 Das AAV-Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein
ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18 bis 30 nm aus,
welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente
20 Vermehrung von AAV ist eine Coinfektion der Wirtszelle mit Helferviren,
beispielsweise mit Adenoviren, Herpesviren oder Vacciniaviren erforderlich. In
Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das
Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die
25 Eigenschaft von AAV, in das Wirtsgenom zu integrieren, macht es als
Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant. Für die
Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen
invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: "Inverted Terminal
Repeats"). Sie tragen die "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung
30 und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante
Vektorpartikel wird ein Helferplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle
Proteine (Rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (Cap-Proteine) trägt, in
verpackungsg geeignete Zellen, z.B. HeLa- oder 293-Zellen, transfiziert, die hierauf
beispielsweise mit Adenovirus infiziert werden. Nach einigen Tagen erhält man ein
30 Lysat, welches rekombinante AAV-Partikel enthält. Geeignete Helferplasmide sind
z.B. bei Chiorini et al., (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1531-1541 oder Girod et al.
(1999); Nat. Med. beschrieben.

Das AAV-Kapsid besteht aus drei verschiedenen Proteinen: VP1, VP2 und VP3, deren relative Anteile 5% VP1, 5% VP2 und 90% VP3 sind. Die AAV-Kapsidgene sind am rechten Ende des AAV-Genoms lokalisiert und werden durch überlappende Sequenzen desselben offenen Leserahmens (ORF) unter Verwendung verschiedener Startkodons kodiert. Das VP1-Gen enthält die ganze VP2-Gensequenz, welche wiederum die ganze VP3-Gensequenz mit einem spezifischen N-terminalen Bereich enthält. Die Tatsache, daß die überlappenden Leserahmen für alle drei AAV-Kapsid-Proteine kodieren, ist für die obligatorische Expression aller Kapsid-Proteine, wenn auch zu unterschiedlichen Anteilen, verantwortlich.

Die Molekularmassen der Kapsid-Proteine sind 87 kD für VP1, 73 kD für VP2 und 62 kD für VP3. Die Sequenzen der Kapsidgene sind in Srivastava, A. et al. (1983), J. Virol., 45, 555-564; Muzyczka, N. (1992), Curr. Top. Micro. Immunol., 158, 97-129, Ruffing, N. et al. (1992), J. Virol., 66, 6922-6930 oder Rutledge, E. A. et al. (1998) J. Virol. 72, 309-319 beispielsweise beschrieben. Die physikalische und genetische Karte des AAV-Genoms ist beispielsweise bei Kotin, R. M. (1994), Human Gene Therapy, 5, 793-801 beschrieben.

Zudem sind verschiedene AAV-Serotypen bekannt, von denen der menschliche AAV-Serotyp 2 (AAV2) ein Virusvektor mit vorteilhaften Eigenschaften für die somatische Gentherapie darstellt. Die wesentlichen Vorteile sind die fehlende Pathogenität für den Menschen, die stabile Integration viraler DNA in das zelluläre Genom, die Fähigkeit, nicht teilende Zellen zu infizieren, die Stabilität des Virions, was die Aufreinigung zu hohen Titern (10^{11} Partikel pro ml) ermöglicht, die geringe Antigenität sowie das weitgehende Fehlen viraler Gene und Genprodukte im rekombinanten AAV-Vektor, was unter Sicherheitsaspekten für die Verwendung in der Gentherapie vorteilhaft ist. Die Klonierung von Genen in den AAV-Vektor erfolgt mittlerweile nach den dem Fachmann allgemein bekannten Methoden, wie

sie z.B. in WO 95/ 23 867, bei Chiorini, J. A. et al. (1995), Human Gene Therapy, 6, 1531-1541 oder bei Kotin, R. M. (1994), supra, beschrieben sind.

Für die Verwendung von AAV als viralen Transduktionsvektor werden im
5 allgemeinen hohe Titer an rekombinanten AAV-Partikeln benötigt. Durch die
naturgegebene, verhältnismäßig geringe Produktion von Partikeln ist ein Weg,
hohe Titer zu erzielen, eine effiziente Anreicherung der Partikel. Des weiteren
müssen die Partikel insbesondere für in vivo Anwendungen möglichst frei sein
10 von Verunreinigungen, die aus zellulären Bestandteilen, Helferviren und
Mediumbestandteilen bestehen können. Somit ist es notwendig, eine verbesserte
Aufreinigung für AAV-Partikel zur Verfügung zu haben.

Ein grundlegende Möglichkeit zur Aufreinigung bietet die Chromatographie. Bei
diesem physikalischen Trennverfahren erfolgt die Stofftrennung durch Verteilung
15 zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Anhand der physikalischen
Vorgänge läßt sich die Chromatographie in zwei Gruppen einteilen, die
Adsorptionschromatographie mit einem Feststoff als stationärer Phase und die
Verteilungschromatographie bei zwei nicht miteinander mischbaren Phasen,
wobei meist Mischformen vorkommen. Das Trennverhalten eines Stoffes in der
20 Chromatographie hängt dabei von seinen chromatographischen Eigenschaften ab,
insbesondere seiner Größe, seiner Ladung, seinem Adsorptionsverhalten, so seiner
spezifischen Affinität, seiner Hydrophobizität, etc. Damit bieten die
chromatographischen Eigenschaften einen zentralen Ansatzpunkt, um über eine
Veränderung eine Verbesserung der Aufreinigung und damit beispielsweise eine
25 Anreicherung oder höhere Reinheit zu erzielen, wobei bereits, eine reine
Veränderung, beispielsweise gegenüber dem Wildtyp, eine Trennung und damit
bessere Aufreinigung erlauben kann.

Aufreinigungsverfahren für AAV, insbesondere mittels Chromatographie, sind beispielsweise in WO 97/08298 beschrieben, eine Mutation der Strukturproteine von AAV aber nicht. Des weiteren wird in WO 96/00587 auf AAV-Kapsid-Fusionsproteine hingewiesen, die mit der Kapsidbildung nicht interferieren und
5 heterologe Epitope klinisch relevanter Antigene enthalten sollen, wodurch aber lediglich eine Immunantwort induziert werden soll. Die Veröffentlichung enthält außerdem nur einen allgemeinen Hinweis auf die Fusionsproteine ohne nähere Angaben zur Ausführbarkeit, insbesondere zu geeigneten Insertionsstellen. Eine Änderung chromatographischer Eigenschaften insbesondere zur Verbesserung der
10 Aufreinigung, z.B. durch Änderung der Affinitäten, wird aber nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war es daher, die Reinigungseigenschaften des AAV-Virus, insbesondere eines Strukturproteins, gegenüber dem Wildtyp zu verändern.

15

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Struktur- bzw. Kapsid-Proteine von AAV so modifiziert werden können, daß dadurch eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften bewirkt wird.

20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Strukturprotein von AAV, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt. Dabei ist bevorzugt, daß die Änderung der chromatographischen Eigenschaften eine Verbesserung der Aufreinigung ermöglicht, insbesondere eine Anreicherung des Virus, bevorzugt der Virus-Partikel,
25 zu höheren Titern, eine Aufreinigung zu größerer Reinheit und/oder eine effizientere Aufreinigung. Durch die veränderten chromatographischen Eigenschaften kann beispielsweise ein spezifischerer bzw. effizienterer Reinigungsschritt für Virus-Partikel im Rahmen einer Aufreinigung erzielt werden, der zu höheren Partikeltitern, zu reineren Partikeln oder zu einer effizienteren Aufreinigung führt. Der Titer

rekombinanter Partikel kann z.B. dadurch bestimmt werden, daß eine Partikel-
enthaltende Lösung in einer Verdünnungsreihe auf eine Membran gegeben und diese
Membran mit markierter AAV-DNA hybridisiert wird. Durch den Nachweis der
hybridisierten DNA kann auf die Partikelkonzentration je nach Durchführung des
5 Versuchs qualitativ oder quantitativ rückgeschlossen werden. Die Reinheit der
Partikel kann durch das Verhältnis des Strukturproteins bzw. der Partikelproteine zu
partikelfremden Proteinen bestimmt werden. Eine effizientere Aufreinigung liegt im
Sinne der vorliegenden Erfindung dann vor, wenn die Aufreinigung beispielsweise
aus weniger Schritten besteht, schneller verläuft oder insbesondere für eine
10 großtechnische Anwendung billiger in der Durchführung ist.

Im Sinne dieser Erfindung liegt eine Änderung der chromatographischen
Eigenschaften des Virus verbunden mit einer Verbesserung der Aufreinigung
beispielsweise bereits dann vor, wenn die Mutation lediglich eine Verschiebung des
15 Elutionsverhaltens auf einer Chromatographiesäule bewirkt, also beispielsweise zu
niedrigeren oder höheren Salzkonzentrationen hin. Allgemeines Problem bei
chromatographischen Reinigungen ist, daß die gewünschten Produktfraktionen (z.B.
Viruspartikel) und Fraktionen von Verunreinigungen (andere Viren, Wildtyp-Viren,
Reste von Zelllysaten, Serumproteine) bei gleichem Salzgehalt in der gleichen
20 Fraktion eluiert werden. Durch eine erfindungsgemäße gezielte Mutation und die
damit verbundene Verschiebung des Elutionsverhaltens eluiert die Fraktion mit den
gewünschten, mutierten Viruspartikeln dann aber nicht mehr mit der verunreinigten
Fraktion sondern in einer anderen Elutionsfraktion (z.B. - je nach Ladung - bei
höheren oder niedrigeren Salzkonzentrationen). Unter Umständen, aber nicht immer,
25 bieten dabei Verschiebungen zu hohen Salzkonzentrationen, beispielsweise durch
Insertion überwiegend positiv geladener Aminosäuren oder His-TAG in das
Kapsidprotein, besondere Vorteile, da Verunreinigungen meist kleine Bestandteile
sind und bei üblichen Reinigungsverfahren meist bei geringeren Salzkonzentrationen
eluierten. Die Kapsidmutanten binden dann beispielsweise besser an das
30 Säulenmaterial und eluieren später, also bei höheren Salzkonzentrationen.

Es ist besonders bevorzugt, daß die Mutation im erfindungsgemäßen Strukturprotein keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus, insbesondere aber auch eine Erhöhung der Infektiosität, bewirkt. Unter
5 Infektiosität versteht man im Sinne dieser Erfindung die Fähigkeit, Zellen zu transduzieren.

Des weiteren ist das modifizierte Strukturprotein vorzugsweise weiterhin zur Partikelbildung, d.h. zur Ausbildung eines ikosaedrischen Kapsids, befähigt,
10 insbesondere in Form eines AAV-Kapsids, da Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind. Die Bildung von Partikeln läßt sich beispielsweise durch Elektronenmikroskopie nachweisen. Ein anderer Nachweis ist das Sedimentationsverhalten während einer Cäsiumchlorid-
15 Dichtegradientenzentrifugation mit anschließendem, optionalen Nachweis von in den Partikeln enthaltener viraler DNA.

Im allgemeinen kann (können) die Mutation(en) im VP1-, VP2- und/oder VP3-Strukturprotein liegen, wobei das VP1- und/oder das VP3-Strukturprotein
20 bevorzugt sind. Des weiteren kann das Strukturprotein von allen AAV-Serotypen abgeleitet sein, insbesondere von humanen Serotypen, vorzugsweise von AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 und/oder AAV6, vor allem von AAV2, AAV3 und/oder AAV6.

25 Die genannte Mutation kann eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), insbesondere eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombinationen der genannten Modifikationen sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Aminosäuren einer funktionellen Sequenz insertiert, vorzugsweise solche, die für die Affinitätschromatographie geeignet sind.

5 Unter Affinitätschromatographie versteht man eine Methode der Chromatographie, die auf der Fähigkeit bestimmter zusammengehöriger Partner wie Antigen-Antikörper, Enzym-Substrat etc. beruht, sich gegenseitig zu erkennen und miteinander in Wechselwirkung zu treten. Dabei wird meist einer der zusammengehörigen Partner an ein chromatographisches Sorbens als Träger
10 fixiert, an den dann die spezifisch passende Komponente bindet. Anschließend wird mit verändertem pH, anderer Ionenstärke oder z.B. Analogen der passenden Komponente eluiert. Umfaßt ist damit auch die kovalente Chromatographie z.B. über Bildung von Disulfid-Brücken und die hydrophobe Chromatographie, bei der hydrophobe Wechselwirkungen ausgenutzt werden.

15

Insbesondere kann die insertierte Aminosäure aus folgender Gruppe ausgewählt sein: einem Liganden eines Rezeptors oder dem Rezeptor eines Liganden, einem Antikörper oder Teil eines Antikörpers, insbesondere einem Antikörper-Epitop, einem Antigen oder Antigen-Epitop, einem Hormon, einem Hormorezeptor,
20 einem Enzym, einem Enzymsubstrat, einem Lektin und/oder einer zuckertragenden Aminosäure.

Vorzugsweise können dies sein:

- ein Histidin-reiches Peptid (His-TAG), das eine Aufreinigung über ein Metall-Chelat-Affinitätsmedium ermöglicht;
25
- ein Peptid mit mehreren Ladungen, das das Bindungs- bzw. Elutionsverhalten während einer Ionenaustauschchromatographie verändert und so einen derartigen Reinigungsschritt spezifischer oder effizienter gestaltet;

- die Glutathion-S-Transferase (GST-Tag), das eine Aufreinigung über ein Glutathion-Affinitätsmedium ermöglicht;
- ein F_c-Rezeptor, der eine Aufreinigung über ein Protein A- oder Protein G-Affinitätsmedium ermöglicht;
- 5 • ein bestimmtes Antikörper-Epitop, das eine Aufreinigung über ein Medium mit gekoppelten Antikörpern ermöglicht, die für das Epitop spezifisch sind;
- ein Lecitin, das eine Aufreinigung über ein Glycoprotein-Medium ermöglicht;
- eine Nukleinsäure-Bindestelle, die eine Aufreinigung über Nukleinsäure-Medien ermöglicht;
- 10 • eine Heparin-Bindestelle, die eine Aufreinigung über ein Heparin-Medium ermöglicht;
- ein bestimmter Ligand, der eine Aufreinigung über ein Medium mit dem entsprechenden Rezeptor ermöglicht oder
- ein bestimmter Rezeptor, der eine Aufreinigung über ein Medium mit dem
- 15 entsprechenden Liganden ermöglicht.

Ebenfalls bevorzugt sind ein Integrin, ein Cytokin oder eine Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindende einzelkettige Antikörper, ein Antikörper gegen

20 Zelloberflächenstrukturen, ein Epitop und/oder eine antikörperbindende Struktur.

In einer bevorzugten Ausführung wird ein Peptid mit beispielsweise 5 bis 30 Aminosäuren, vorzugsweise 8 bis 20 Aminosäuren und insbesondere 10 bis 18 Aminosäuren inseriert. Das Peptid hat beispielsweise die Sequenz

25 QAGTFALRGDNPQG oder eine Sequenz, die zu dieser stark homolog ist. Bei diesem besonders bevorzugten Liganden handelt es sich um das P1-Peptid, das ein 14 Aminosäuren langes Peptid aus der Core-Sequenz einer Alpha-Kette der

Laminin-Familie darstellt. Diese Sequenz ist beispielsweise ausreichend, um einen Integrin-Rezeptor zu erkennen, der u.a. die Endozytose viraler Partikel, z.B. von Adenovirus, vermittelt. Das P1-Peptid bindet unabhängig von seiner Konformation (linear oder zirkulär) an den Integrin-Rezeptor. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die kodierende DNA-Sequenz des P1-Peptids in das Gen kodierend für ein Strukturprotein von AAV, welches beispielsweise auf einem Helferplasmid liegt, eingebaut. Nach der Verpackung mit dem mutanten Helferplasmid erhält man rekombinantes AAV mit P1 im Kapsid (rAAV-P1). Für die Insertion dieses Peptids konnte gezeigt werden, daß diese AAV-Partikel im Vergleich zu unmodifizierten AAV-Partikeln bereits bei niedrigerer Leitfähigkeit von einem Kationenaustauscher eluieren und so, je nach Bedingungen, eine verbesserte Trennung (z.B. vom Wildtyp) und Aufreinigung erlauben.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Strukturprotein, das mindestens eine weitere Mutation enthält. Darunter ist zu verstehen, daß das Strukturprotein neben einer Mutation, die eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt, auch eine weitere Mutation enthält, die nicht zwangsläufig auch eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt. Besonders bevorzugt ist hier eine weitere Mutation, die eine Änderung, vorzugsweise Erhöhung, der Infektiosität des Virus bewirkt.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Strukturprotein von AAV, bei dem die weitere(n) Mutation(en) eine Verringerung der Antigenität bewirkt (bewirken).

25

Unter Antigenität versteht man im Sinne dieser Erfindung die Auslösung sowohl einer Antikörperbildung als auch -bindung aufgrund des Immunsystems. Der Begriff umfaßt auch die Immunogenität, also die Auslösung einer Immunantwort. Unter der Verringerung der Antigenität versteht man daher die Verringerung der

BEST AVAILABLE COPY

Antikörperbildung und -bindung sowohl durch Verringerung der antigenen Epitope, als auch durch Verringerung der antigenen Wirkung bestimmter Epitope oder durch Veränderung und Entfernung bestimmter im Wildtyp vorhandener Epitope. Die veränderte Antigenität kann sich dabei sowohl auf die humorale wie
5 auch die zelluläre Immunantwort beziehen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt/stellen die weiteren Mutation/en eine oder mehrere Deletionen und/oder eine oder mehrere Insertionen im Strukturprotein oder Kombinationen der genannten Modifikationen dar. Dabei
10 ist die Insertion vorzugsweise die Insertion eines Zellmembranrezeptor-Liganden, eines Rep-Proteins oder -Peptids, beispielsweise in Form einer Rep-Domäne, eines immunsuppressiven Proteins oder Peptids und/oder eines Proteins oder Peptids mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese eines Transgens bzw. Fremdgens. Bevorzugt ist hierbei beispielsweise das P1-Peptid (QAGT-
15 FALRGDNPQG) (s.o).

Beispiele von Insertionen bei der weiteren Mutation sind u.a. Integrine, Cytokine oder Rezeptor-Bindungsdomänen von Cytokinen, Integrinen oder Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF, IL-2, IL-12, CD40L, TNF, NGF, PDGF
20 oder EGF, an Zelloberflächenrezeptoren bindende einzelkettige Antikörper, sog. "single chain" Antikörper (scFv), beispielsweise an die Oberflächenrezeptoren CD40, CD40L, B7, CD28 oder CD34 bindende einzelkettige Antikörper, oder Epitope bzw. Rezeptorbindungsstellen, die beispielsweise ihrerseits von bestimmten Antikörpern, beispielsweise Anti-CD40L-monoklonale Antikörper,
25 bzw. von chemischen Substanzen oder Hormonen, z.B. Katecholamine, erkannt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der weiteren Mutation werden antikörperbindende Strukturen, wie z.B. Protein A, Protein G oder anti-Fc-

Antikörper, bzw. Teile hiervon, inseriert. An diese werden wiederum spezifische Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenstrukturen (beispielsweise gegen das CD40 bei lymphatischen Zellen oder gegen das CD34 bei hämatopoietische Zellen) angekoppelt.

5

Vorzugsweise ist/sind die Mutation/en an der Virusoberfläche lokalisiert. Zur Bestimmung der oberflächen-lokalisierten Bereiche der Strukturproteine wurde gemäß der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gefunden, daß CPV- und AAV2-Sequenzen und -Strukturen vergleichbar sind. Man kann daher vorzugsweise auf bekannte Kristallstrukturen von Parvoviren wie von Parvovirus B19 oder von CPV (Canine-Parvovirus) zurückgreifen und mit Hilfe von Homologievergleichen Proteindomänen identifizieren, die auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung hat daher beispielsweise ein computerunterstützter Vergleich zwischen CPV und AAV2 bzw. Parvovirus B19 und AAV2 überraschenderweise reproduzierbar zur Identifikation von Schleifen (Loops) in VP3 geführt, deren Sequenz variiert, d.h. die eine geringe Homologie besitzen und die voraussichtlich auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Da die Antigene für die humorale Immunantwort für Antikörper zugänglich und somit auf der Virusoberfläche sein müssen, stellen diese Schleifen bevorzugte Kandidaten für Mutationen dar. So wurde die bekannte Kristallstruktur des CPV VP2-Kapsid-Proteins (z.B. Luo M.(1988), J. Mol. Biol., 200, 209-211; Wu und Rossmann (1993), J.Mol.Biol., 233, 231-244) aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum AAV2 VP3 in der sekundären Struktur des Proteins als Muster genommen, um die Regionen herauszufinden, die auf der viralen Kapsidoberfläche exponiert sind und die aufgrund der lokalen Aminosäuresequenz flexibel genug sind, beispielsweise die Insertion einer Peptidsequenz zu überstehen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß keine sekundären Strukturelemente des AAV2-Kapsidproteins ausgewählt wurden, die das Kapsid destabilisieren würden.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Mutation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert, da gefunden wurde, daß beispielsweise bei den Parvoviren CPV und B19 der N-Terminus an der Zelloberfläche liegt.

- 5 Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Oberflächen-lokalisierten Bereiche der Strukturproteine ist ein Vergleich der für die Kapside kodierenden Nukleinsäuresequenzen von unterschiedlichen AAV-Serotypen. Hierzu können beispielsweise bekannte DNA-Sequenzen unterschiedlicher AAV-Serotypen, wie AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 oder AAV6, für Strukturanalysen möglicher
- 10 Kapsidmorphologien von beispielsweise AAV2 herangezogen werden, wobei ab initio mögliche Tertiärstrukturen berechnet und Sequenzbereiche aufgrund allgemein bekannter Aminosäure-Eigenschaften den inneren oder äußeren Kapsidbereichen zugeordnet werden können. So konnten beispielsweise gemäß der vorliegenden Erfindung mögliche Insertionsstellen im VP3-Bereich des AAV2-Kapsids ermittelt
- 15 werden, die die Insertion beispielsweise von Peptiden und deren Expression auf der Virusoberfläche ermöglichten (siehe unten).

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird (werden) die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der XhoI-Schnittstelle der VP1-kodierenden
- 20 Nukleinsäure und in einer anderen bevorzugten Ausführungsform an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Strukturproteins entsteht durch eine Deletion zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen, vorzugsweise an der Stelle der
- 25 Deletion.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird (werden) die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die 62 Aminosäuren umfaßt

(Hermonat, P. L. et al. (1984), J. Virol., 51, 329-339) bewirkt. In einer weiteren bevorzugten und entsprechenden Ausführungsform liegt die Deletion(en) zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die innerhalb der oben beschriebenen Deletion liegt und 29 Aminosäuren umfaßt. Diese Deletion
5 hat den Vorteil, daß sie keine Überlappung mit dem rep-Gen hat und daher den Verpackungsmechanismus im wesentlichen nicht beeinflußt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegen ein oder mehrere Insertionen im VP3-Strukturprotein (Rutledge, E. A. et al. (1998) supra) vor und/oder nach
10 mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT, EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFT VDTNG, da diese Stellen an den exponierten Stellen eines Loops liegen, wobei das Risiko gering ist, die VP3-Struktur zu ändern.

15 Die Punktmutation(en), die Mutation(en) mehrerer Aminosäuren, die Deletion(en) oder Insertion(en) wird/werden nach allgemein bekannten Methoden durch Deletion und Insertion in dem für das Strukturprotein codierenden Gen durchgeführt. Die Deletionen lassen sich beispielsweise mittels PCR-unterstützter Mutagenese in die einzelnen Strukturprotein-Gene einführen. Die Insertionen lassen sich nach
20 allgemein bekannten Methoden beispielsweise mittels Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen der entsprechenden Strukturprotein-Gene und anschließender Ligasereaktion einfügen. Die anschließende Expression des mutierten Gens führt zum erfindungsgemäßen Strukturprotein.

25 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein erfindungsgemäßes Strukturprotein in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids, da Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind.

~~BEST AVAILABLE COPY~~

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind eine Nukleinsäure, vorzugsweise eine RNA oder DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA, kodierend für ein erfindungsgemäßes Strukturprotein.

- 5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, beispielsweise eine COS-Zelle, HeLa-Zelle oder 293-Zelle, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Derartige Zellen eignen sich beispielsweise zur Herstellung der rekombinanten AAV-Partikel.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins, insbesondere zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins in Form eines AAV-Partikels, wobei eine geeignete Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure, kodierend für das erfindungsgemäße Strukturprotein kultiviert und ggf. das exprimierte
- 15 Strukturprotein isoliert wird. Beispielsweise läßt sich das erfindungsgemäße Strukturprotein chromatographisch reinigen und isolieren.

- Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf ein Arzneimittel, enthaltend ein erfindungsgemäßes Strukturprotein, eine
- 20 erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder eine erfindungsgemäße Zelle und ggf. geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, wie z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinase-, DNase-Inhibitoren, etc.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die
- 25 Verwendung des erfindungsgemäßen Strukturproteins, einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. einer erfindungsgemäßen Zelle für die Aufreinigung von AAV und AAV-Partikeln, für die Änderung des Tropismus von AAV, für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle, insbesondere einer

Zelle, die vorher einer AAV-Infektion wenig zugänglich war, wie beispielsweise einer hämatopoetischen Zelle, für das genomische Targeting, für die Diagnostik, für Wirksamkeitsuntersuchungen und/oder - in Form von geeigneten rAAV-Vektoren - für die Gentherapie. Unter Gentherapie versteht man eine
5 Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell *In-vitro*- und *In-vivo*-Verfahren. In *In-vitro*-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und *ex-vivo* mit Vektoren transfiziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden.
10 Bei der *In-vivo*-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in den Tumor appliziert.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß durch die
15 erfindungsgemäße Mutagenese von Strukturproteinen von AAV über die Veränderung der chromatographischen Eigenschaften neue Möglichkeiten für spezifischere Aufreinigungsverfahren im wesentlichen ohne Verlust der Verpackungseffizienz rekombinanter AAV-Vektoren in das Kapsid des Virus geschaffen werden können. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, AAV oder
20 AAV-Partikel zu höheren Titern und/oder größerer Reinheit aufzureinigen und die Reinigung effizienter und kostengünstiger zu gestalten. Dies wiederum ermöglicht die großtechnische Anwendung von rekombinanten AAV für Zelltransformationen und Gentherapien im kommerziellen Maßstab.

25 Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt das Chromatogramm für eine Wildtyp-AAV-Probe in einem Lauf über
5 eine POROS 50HS Kationenaustauschssäule. Aufgetragen ist das Durchflußvolumen
gegen die Leitfähigkeit (linke y-Achse) und gegen die Absorption bei 280 nm
(rechte y-Achse). Die AAV-Partikel eluierten in den Fraktionen 12 und 13, was im
Mittel einer Leitfähigkeit von 30 mS/cm (300 mM NaCl) entspricht (siehe dicker
horizontaler Strich).

10

Figur 2 zeigt das Chromatogramm für eine AAV-Probe bestehend aus mutierten
AAV-Partikeln (Insertion des Peptids QAGTFALRGDNPQG nach Aminosäure
587; pI587 gemäß Beispiel 3) in einem Lauf über eine POROS 50HS
Kationenaustauschssäule. Aufgetragen ist das Durchflußvolumen gegen die
15 Leitfähigkeit (linke y-Achse) und gegen die Absorption bei 280 nm (rechte y-
Achse). Die modifizierten AAV-Partikel eluierten in den Fraktionen 6 und 7, was im
Mittel einer Leitfähigkeit von 22 mS/cm (220 mM NaCl) entspricht (siehe dicker
horizontaler Strich).

20

Beispiele

Beispiel 1:

Mittels PCR-unterstützter Mutagenese und Schneiden mit den Restriktionsenzymen
XhoI, BsrBI bzw. HindIII wurden folgende Mutationen hergestellt:

Mutationen im VP1

BEST AVAILABLE COPY

- 5 a) Deletion zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen des VP-1 (Δ Xho;
62 Aminosäuren, AS) (Hermonat et al. (1984) Journal of Virology 51, 329
- 339),
- b) Deletion zwischen BsrBI und HindII-Schnittstellen des VP-1, die
innerhalb von der obigen Deletion a) liegt und 29 AS umfaßt (Δ BH);
- 10 c) Deletion zwischen BsrBI und HindII, sowie Insertion eines Liganden
(P1-Peptid) (Δ BH+L); und
- d) Reine Insertion des Liganden (P1-Peptid) an der BsrBI-Schnittstelle
(B+L).

15 Mutationen im VP3

- a) ins261; YKQIS SQSGA
- b) ins381; YLTLN NGSQA
- c) ins447; YYLSR TNTPS
- 20 d) ins534; EEKFF PQSGV
- e) ins573; NPVAT EQYGS
- f) ins587; LQRGN RQAAT
- g) ins713; NVDFV VDTNG

BEST AVAILABLE COPY

(Nomenklatur nach Zahl der Aminosäuren (AS) gezählt nach den AS ab Beginn des N-Terminus im VP-1 von AAV2, umrahmt von jeweils 5 N-terminal davon gelegenen und 5 C-terminal davon gelegenen Aminosäuren; die AS, nach der die Insertion eingebracht wurde, ist in Fettschrift dargestellt).

5

Es ist auch möglich, daß in die fünf unmittelbar benachbarten AS, die neben der fett markierten AS liegen, ebenfalls eine Insertion eingebracht wird, da diese ebenfalls innerhalb eines Loops im AAV2-Kapsid liegen.

10 Beispiel 2:

Charakterisierung der Kapsidmutanten

15

Nach Durchführung der Mutationen im AAV2-Genom und Verpackung der mutierten Viren mit LacZ-Reportergen wurden die physikalischen Vektor-Titer durch Dot-Blot und Kapsid-Titer mit A20-Antikörper-ELISA bestimmt und erste Infektionstests auf HeLa-Zellen durchgeführt. Dadurch konnte bestimmt werden, ob die Mutationen die Struktur der VP-Proteine oder die Interaktion zwischen verschiedenen VP-Proteinen so stören, daß eine Verpackung unterbleibt bzw. die Infektion der Zielzelle gestört wird (Tabelle 1).

20

Tabelle 1: Verpackungseffizienz der hergestellten Virusmutanten

Virusstock	physikalische Virustiter	Kapsid-Titer (ELISA mit A20-MAb)
Wildtyp-Kapsid	$1 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{11}$
VP1-Mutanten		
Δxho	$6 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{10}$
ΔBH	$8 \cdot 10^{11}$	$4 \cdot 10^9$
$\Delta BH+L$	$1 \cdot 10^{13}$	$5 \cdot 10^{10}$
B+L	$3 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^9$
VP3-Mutanten		
ins261	$1 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins381	$3 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins447	$1 \cdot 10^{12}$	$4 \cdot 10^{10}$
ins534	$1 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins573	$3 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins587	$1 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{10}$
ins713	$5 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$

Gezeigt sind die physikalischen Virustiter (Dot-Blot) und Kapsid-Titer (A20-Kapsid-ELISA). Die Konzentrationen sind in Partikel/ml angegeben.

BEST AVAILABLE COPY

Für alle 4 VP1-Mutanten konnte gezeigt werden, daß Mutationen die Verpackungseffizienz nicht beeinflussen und alle mutierten Viren mit ähnlichen guten Titern wie Vektoren mit unmutiertem Kapsid verpackt werden können ($\sim 10^{12}$ Partikel/ml). Auch die AAV-Vektoren mit Mutationen im VP3-Bereich konnten erfolgreich verpackt werden (10^{10} - 10^{12} physikalische Partikel/ml).

Beispiel 3

10 P1-Mutation in VP3

Zunächst wurde von einem Plasmid pUC-AV2, das durch Subklonierung des 4.8-kb BglIII-Fragments des pAV2 (ATCC 37261, ref. 53) in die BamHI Schnittstelle des pUC19 (New England BioLabs Inc.) hergestellt wurde, ausgegangen. Mittels dem Fachmann bekannter PCR-unterstützter Mutagenese wurden an definierten Stellen des Plasmids Mutationen vorgenommen. Dabei wurde eine für P1, ein 14-AS-Peptid, mit der AS-Sequenz QAGTFALRGDNPQG, das das RGD-Bindungsmotiv eines Lamininfragments (Aumailly et al. (1990) FEBS Lett. 262, 82-86) enthält, codierende Sequenz nach den Nukleotiden 2985, 3543 und 3963 eingefügt. Dies entspricht einer Insertion nach den Aminosäuren 261, 447 und 587 des AAV2-Kapsidproteins (Nomenklatur nach Zahl der Aminosäuren (AS) gezählt nach den AS ab Beginn des N-Terminus im VP-1 von AAV2). In der anschließenden PCR werden jeweils 2 mutationsspezifische Primer und als Matrize ein Plasmid, pCap verwendet, das nur das cap-Gen enthält und dadurch gebildet wird, daß das 2.2 kb EcoRI-BspMI-Fragment aus pUC-Av2 herausgeschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle des pUC19 eingefügt wird. Anschließend werden die PCR Produkte in Bakterien amplifiziert, sequenziert und das 1.4-kb EcoNI-XcmI-Fragment, das P1 enthält in pUC-AV2, in dem die korrespondierende Wildtyp-cap-Sequenz herausgeschnitten wurde, subkloniert. Dementsprechend

enthielten die nach den AS-Insertionsstellen pI-261, pI-447 und pI-587 genannten Plasmide (Mutanten) das komplette AAV2-Genom.

Beispiel 4

5 Herstellung von AAV2-Partikel

10 HeLa-Zellen (eine humane Cervix-Epithel-Zelllinie) wurden mit den Plasmiden gemäß Beispiel 1 transfiziert, dann ca. 20h inkubiert und anschließend mit Adenovirus Typ 5 infiziert. 72 h nach der Infektion wurden die Zellen aufgeschlossen und die AAV2-Partikel über einen CsCl-Gradienten gereinigt.

Beispiel 5

Charakterisierung der Kapsidmutanten gemäß Beispiel 3

15 In diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Kapsidmutanten das virale Genom verpacken und vollständige Kapside zu bilden können. AAV2-Partikel der Mutanten gemäß Beispiel 4 wurden darauf überprüft, ob und wenn ja wieviele Partikel das Virus-Genom tragen und wieviel DNA in den Kapsid-Mutanten verpackt war. Dazu wurden die gemäß Beispiel 4 gereinigten Viruspartikel
20 (Mutanten und Wildtyp) mit DNase behandelt, geblottet und mit einer Rep-Sonde hybridisiert.

Der sich daraus ergebende Titer zeigte keine quantitative oder qualitative Differenz im Vergleich zum Wildtyp (s. Tabelle 2). Die Viren behielten die
25 Fähigkeit, daß Genom zu verpacken.

Durch Elektronenmikroskopanalyse konnte weiter bestätigt werden, daß auch das Kapsid ausgebildet wird.

BEST AVAILABLE COPY

Daher wurden die Mutationen nicht in Bereichen vorgenommen, die für die korrekte Faltung, die Kapsid-Zusammensetzung oder die Verpackung des Genoms von Bedeutung sind. Die erfindungsgemäßen AAV-Partikel sind in ihrer Funktion ungestört.

5

Um ablesen zu können, ob die mutierten Kapside vollständig gebildet werden und kein veränderte Antigenität zeigen, wurden in einem weiteren Experiment A20 monoklonale Antikörper (A20MAb) in einem ELISA eingesetzt. A20MAb reagieren spezifisch mit komplett zusammengesetztem AAV2-Kapsid des Wildtyps (Wistuba et al., (1997), J. Virol. 71, 1341-1352). Auch hier sind die Ergebnisse in Tabelle 1 dargestellt. Dabei zeigt sich, daß durch die Insertion in den Mutanten pI-447 und pI-587 die Kapsid-Bildung nicht gestört wird, während bei pI-261 der A20 monoklonale Antikörper nicht mehr bindet, was aber, da sich die Kapside nach Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop trotzdem bilden, auf eine Veränderung der Antigenität zurückzuführen ist.

15

Tabelle 2 Verpackungseffizienz und Antigenität der hergestellten Virusmutanten gemäß Beispiel 3

Virusstock	physikalische Virustiter	ELISA mit A20-MAb
Wildtyp-Kapsid	$8 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$
Mutanten		
I-261	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-381	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-447	$1 \cdot 10^{13}$	$8 \cdot 10^{11}$
I-587	$4 \cdot 10^{13}$	$3 \cdot 10^{12}$

Gezeigt sind die physikalischen Virustiter (Dot-Blot) und der Titer mit A20-Kapsid-ELISA. Die Konzentrationen sind in Partikel/ml angegeben. „n.m.“ heißt „nicht meßbar“.

5 Beispiel 6:

Verändertes Elutionsverhalten der Kapsidmutanten

10 Rekombinante wildtyp-AAV (in 20 mM Hepes pH 6.8, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$) wurden auf eine 0,8 ml POROS 20HS Kationenaustauschersäule (Perkin-Elmer, Weiterstadt) geladen. Es wurde mit Hilfe eines Äkta-Systems (Pharmacia) ein Gradient von 30 Säulenvolumina von 100 bis 700 mM NaCl in 20 mM Hepes 6.8 angelegt. Gemäß Western Blot Analyse eluierte AAV in den Fraktionen 12 und 13, was einer Elution von wildtyp-AAV bei 30 mS/cm (=ca. 300 mM NaCl) entspricht (siehe Fig. 1).

15

Eine Kapsidmutante (I-587 gem. Beispiel 3) von AAV (das P1-Peptid QAGTFALRGDNPQG ist inseriert nach Aminosäure 587; in PBS, pH 6,8) wurde auf dieselbe 0,8 ml POROS 20HS Kationenaustauschersäule (siehe oben) aufgetragen. Es wurde in einem Äkta-System mit einem Gradienten von 30 Säulenvolumina 50-1000 mM NaCl in 20 mM Hepes pH 6.8 eluiert. Die AAV-Mutante befand sich gemäß Western Blot Analyse in den Fraktionen 6 und 7. Dies entspricht einer Elution von ca. 22 ms/cm (= ca. 220 mM NaCl) (siehe Fig. 2).

25 Dies zeigt, daß durch die Insertion des QAGTFALRGDNPQG-Peptids sich das Elutionsverhalten der AAV-Partikel ändert, so daß bei gleichem pH Wert die mutierten Partikel bei einer geringeren Salzkonzentration eluieren als die wildtyp-Partikel. Damit wird die Virusfraktion zu anderen, unter Umständen weniger verunreinigten bzw. sonst geeigneteren Fraktionen hin verschoben. Daher ist es

möglich, durch Insertionen, Deletionen oder sonstige Veränderungen der Kapsidproteine die chromatographischen Eigenschaften der AAV-Partikel zu ändern. Insbesondere kann in einer Variante der gezeigten Insertion durch Einfügen von Aminosäuren mit überwiegend positiver Ladung, beispielsweise an
5 den in den Beispielen gezeigten Insertionsstellen, erfindungsgemäße Kapsid-Mutanten konstruiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp (der in einem breiten, leichter verunreinigten Peak eluiert) bei höheren Salzkonzentrationen eluieren. Die Affinität der Mutante zum Säulenmaterial ist dadurch verstärkt, so daß die Elution erst bei hohen Salzkonzentrationen erfolgt, also in Bereichen, die
10 üblicherweise weniger durch kleinere Fremdproteine verunreinigt sind.

Beispiel 7:

Infektionstests mit Mutanten gemäß Beispiel 3

15 Um den Tropismus der Kapsidmutanten I-261, I-381, I-447 und I-587 zu testen, wurden Zelllinien, Co-115 und B16F10, mit den mutierten Viren infiziert. Co-115-Zellen wurden zum Testen des Wildtyprezeptor-Tropismus der Virionen verwendet, da diese mit Wildtyp AAV2 transduziert werden können und das P1-Peptid nicht binden. Die B16F10-Zelllinie wurde aus den in Beispiel 9 bereits
20 genannten Gründen verwendet. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen durch Immunofluoreszenzmessung mit Hilfe eines anti-Rep-Antikörpers darauf untersucht, ob das virale Rep-Protein exprimiert wird (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352; Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319). Zellen wurden auf Objektträgern zu 70 % Konfluenz gezüchtet und mit verschiedenen
25 Konzentrationen erfindungsgemäßer viraler Präparationen in serumfreiem Medium zusammen mit Adenovirus 5 inkubiert. Die Titer der viralen Präparationen wurden drei Tage später entweder durch in-situ-Detektion der Rep-Proteinsynthese in einem Immunofluoreszenzassay (Rep-Titer) bestimmt. Dabei wurde die Immunofluoreszenzanfärbung mit AAV2-infizierten Zellen nach einer
30 Methode von Wistuba et al. (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352;

Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319) durchgeführt. Die Objektträger wurden einmal mit PBS gewaschen, in Methanol (5 min, 4°C) fixiert und anschließend mit Aceton (5 min, 4°C) behandelt. Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Antikörper 76-3, der mit Rep-Proteinen von AAV2 reagiert, inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und für
5 eine Stunde mit einem Rhodamin-konjugierten Anti-Maus-sekundären Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 1% BSA inkubiert. Die Titer wurden aus der letzten limitierenden Verdünnung der viralen Stammlösung errechnet, die zu fluoreszenzpositiven Zellen geführt hatten.

10

Rep-positive CO115-Zellen konnten nach Infektion mit Wildtyp AAV2 und mit Mutanten I-261, I-447 und I-587 detektiert werden. Bei CO115-Zellen war die Infektiosität von I-261, I-587 und I-447 um zwei bis drei Größenordnungen kleiner als die des Wildtyps (Tabelle 3). Die Transfektion von B16F10-Zellen war
15 mit I-447 genauso ineffektiv wie die mit Wildtypvirus (Tabelle 3). In klarem Gegensatz dazu sind nach Infektion mit I-587 rep-positive B16F10-Zellen feststellbar, wobei der Titer des I-587-Virus auf 1×10^6 Rep-EFU/ml bestimmt wurde (Tabelle 3).

20 Um zu untersuchen, ob die Transfektion von B16F10-Zellen durch die Mutante I-587 spezifisch durch die Interaktion zwischen der P1-Sequenz auf der Oberfläche des mutierten Kapsids und dem Integrinrezeptor auf der Oberfläche der B16F10-Zellen vermittelt wurde, wurden die Zellen entweder mit dem konkurrierenden RGDS oder dem inaktiven RGES-Peptid bei Konzentrationen von 200 µmol vor
25 der Infektion mit dem Virus inkubiert. Die Zugabe von RGDS-Peptid neutralisierte die Infektiosität von I-587 auf B16F10-Zellen (Tabelle 3), während das Kontrollpeptid RGES keinen Effekt hatte.

30

BEST AVAILABLE COPY

Tabelle 3: Virustiter auf der Zelloberfläche

Virusstock	Titer auf CO115-Zellen	Titer auf B16F10-Zellen	
		-RGDS	+RGDS
Wildtyp-Kapsid	$2 \cdot 10^9$	<1	nb
Mutanten			
I-261	$7 \cdot 10^6$	nb	nb
I-381	n.m.	nb	nb
I-447	$1 \cdot 10^6$	<1	nb
I-587	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	<1
rAAV/LacZ	$5 \cdot 10^7$	<1	nb
rAAV(I-587)/LacZ	$6 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	<1

Gezeigt sind die Titer auf den wildtypanfälligen CO115-Zellen und den wildtypresistenten B16F10-Zellen. Die Titer sind für I-447 und I-587 wie den Wildtyp in Rep-EFU/ml und für rAAV/LacZ und rAAV(I-587)/LacZ in LacZ-EFU/ml ausgedrückt. Dabei bedeutet EFU expressionsbildende Einheiten (Expressing Forming Unit) und nb heißt „nicht bestimmt“. „n.m.“ heißt „nicht meßbar“.

Beispiel 8:

10 Infektionsassay der Mutanten gemäß Beispiel 3 mit Galaktosidase

In einem weiteren an Beispiel 6 angelehnten Versuch wurden rAAV-Vektoren mit einem LacZ-Reportergen hergestellt, die entweder den Wildtyp (rAAV-Virion) oder I-587 (rAAV(I-587)-Virion) enthielten. Die Viralpräparationen wurden
15 rAAV/LacZ und rAAV(I-587)/LacZ genannt und zur Infektion von B16F10- bzw. CO115-Zellen (Kontrollen) verwendet.

Infizierte Zellen wurden drei Tage nach der Infektion durch X-Gal-Anfärbung auf β -Galaktosidase-Expression getestet. Dabei wurde der X-Gal-in-situ-Test zur zytochemischen Anfärbung (LacZ-Titer) verwendet. Nach diesem wurden die Zellen, um die Expression von β -Galaktosidase zu testen, einmal in PBS
5 gewaschen und dann mit 1,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) behandelt, wie bereits von Chiorini et al. (1995) Hum. Gen. Ther. 6, 1531-1541, beschrieben. Die Titer wurden aus der letzten limitierenden Verdünnung der viralen Stammlösung errechnet, die zu β -Galaktosidase-produzierenden Zellen geführt
10 hatte.

Bei den Kontrollen an CO115-Zellen waren beide Virionen infektiös, allerdings rAAV (I-587)/LacZ um 2 Größenordnungen weniger effektiv. Bei Typ B16F10 wurden – wie erwartet – nach der Infektion mit rAAV/LacZ keine β -
15 Galaktosidase-positiven Zellen gefunden. Nach der Infektion mit rAAV(I-587)/LacZ hingegen fanden sich überraschenderweise deutlich viele β -Galaktosidase-positive Zellen. Der Titer von rAAV-(I-587)/LacZ wurde mit 5×10^4 LacZ-EFU pro ml bestimmt. Die Infektiosität von rAAV-Vektoren gegenüber B16F10-Zellen wurde durch die erfindungsgemäße Mutation um mehr als vier
20 Größenordnungen verbessert (Tabelle 3).

MediGene AG

19. Juli 1999

M29255 BÖ/HP

BEST AVAILABLE COPY

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus (AAV), dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine Mutation enthält, die eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt.
10
2. Strukturprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Änderung der chromatographischen Eigenschaften eine Verbesserung der Aufreinigung ermöglicht, insbesondere eine Anreicherung des Virus, vorzugsweise der Virus-Partikel, zu höheren Titern, eine Aufreinigung zu größerer Reinheit und/oder eine effizientere Aufreinigung.
15
3. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus bewirkt.
20
4. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation auch eine Erhöhung der Infektiosität des Virus bewirkt.
- 25 5. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das mutierte Strukturprotein zur Partikelbildung befähigt ist.

6. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es ausgewählt ist aus mutiertem VP1, mutiertem VP2 und/oder mutiertem VP3.
- 5 7. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es abgeleitet ist von AAV2, AAV3, AAV4, AAV 5 und/oder AAV6 sowie anderen von diesen, insbesondere von AAV2, abgeleiteten AAV-Serotypen.
- 10 8. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), insbesondere eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombinationen der genannten Modifikationen ist.
- 15 9. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Aminosäuren einer funktionellen Sequenz inseriert werden, die vorzugsweise für die Affinitätschromatographie geeignet sind.
- 20 10. Strukturprotein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die insertierte Aminosäure ausgewählt ist aus einem Liganden eines Rezeptors oder dem Rezeptor eines Liganden, einem Antikörper oder Teil eines Antikörpers, insbesondere einem Antikörper-Epitop, einem Antigen oder Antigen-Epitop, einem Hormon, einem Hormorezeptor, einem Enzym, 25 einem Enzymsubstrat, einem Lektin, zucker-tragenden Aminosäuren, insbesondere aus einem Histidin-reichen Peptid (His-Tag), einem mehrfach geladenen Peptid, der Glutathion-S-Transferase (GST-Tag), einem F_c-Rezeptor, einem Lecitin, einer Nukleinsäure-Bindestelle, einer

5 Heparin-Bindestelle, einem spezifischen Liganden, einem spezifischen Rezeptor, einem Integrin, einem Cytokin oder einer Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindenden einzelkettigen Antikörper, einem Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, einem Epitop und/oder einer antikörperbindenden Struktur.

10 11. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein Peptid insertiert wird, das die Sequenz QAGTFALRGDNPQG hat.

12. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine weitere Mutation enthält.

15 13. Strukturprotein nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine Änderung der Infektiosität des Virus bewirkt.

20 14. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt.

25 15. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine oder mehrere Deletion(en), eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombination der genannten Modifikationen ist/sind.

16. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ein Zellmembranrezeptor-Ligand, ein Rep-Protein oder -Peptid, ein immunsuppressives Protein oder Peptid und/oder ein Protein oder Peptid mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese des Fremdgens ist.
17. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ausgewählt ist aus einem Integrin, einem Cytokin oder einer Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindenden einzelkettigen Antikörper, einem Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, einer antikörperbindenden Struktur oder einem Epitop.
18. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) an der Virusoberfläche lokalisiert ist/sind.
19. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert ist/sind.
20. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der XhoI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

21. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

BEST AVAILABLE COPY

- 5 22. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen bewirkt wird/werden.

- 10 23. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

- 15 24. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

- 20 25. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Insertionen in VP3 vor und/oder nach mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTNL NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFT VDTNG, lokalisiert ist/sind.

25

26. Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 25 in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids.

BEST AVAILABLE COPY

27. Nukleinsäure, kodierend für ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26.
- 5 28. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 27.
29. Verfahren zur Herstellung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zelle gemäß Anspruch 28 kultiviert und ggf. das exprimierte Strukturprotein isoliert wird.
- 10 30. Arzneimittel, enthaltend ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26, eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 27 und/oder eine Zelle gemäß Anspruch 28 und/oder gegebenenfalls Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 15 31. Verwendung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26, einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 27 bzw. einer Zelle gemäß Anspruch 28 für die Aufreinigung von AAV und AAV-Partikeln, für die Änderung des Tropismus von AAV, für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle, für das genomische Targeting, für die Diagnostik, für Wirksamkeitsuntersuchungen und/oder für die Gentherapie.
- 20

MediGene Aktiengesellschaft

19. Juli 1999

M29255 BÖ/HP

BEST AVAILABLE COPY

5

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.

10

Fig. 1

BEST AVAILABLE COPY

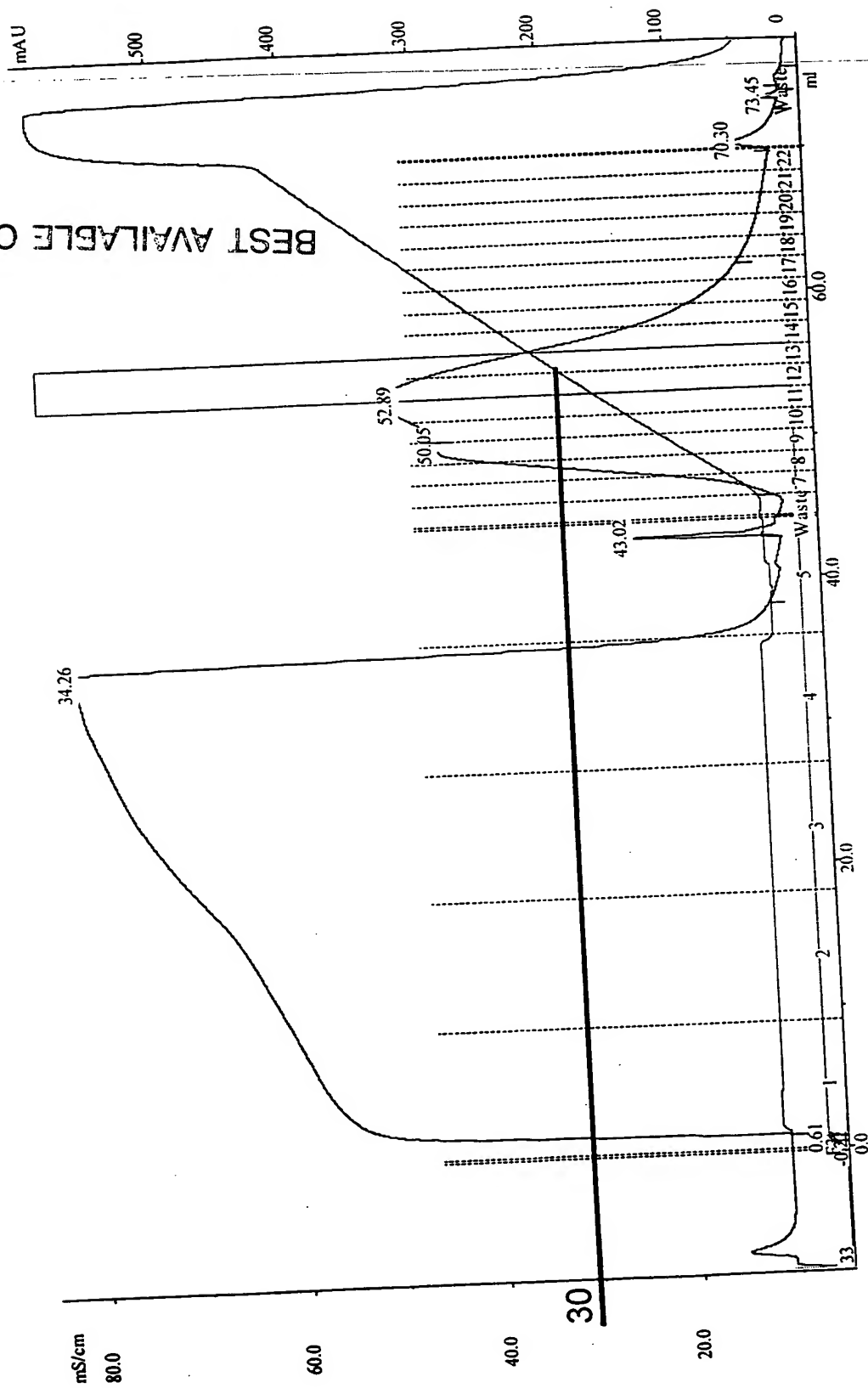


Fig. 2

